

新型コロナウイルス感染症による肺炎を含む急性呼吸窮迫症候群(ARDS)の喫煙・炎症因子関連分子メカニズムの解明と新規治療法の確立

横浜市立大学医学部救急医学教室助教
小川 史洋

(研究目的)

急性呼吸促迫症候群 (acute respiratory distress syndrome、ARDS)、急性肺損傷 (acute lung injury、ALI) は、死亡率が高く、肺胞領域の非特異的炎症による透過性亢進型肺水腫でがその特徴とされる。その原因として、薬剤・感染症・大量輸血などによって肺胞領域に生じた非特異的な過剰炎症反応に起因する死亡率の非常に高い呼吸障害である。

本症の病態に関し、疫学的研究・病因の解明など研究が世界中で行われてきたが、いまだ不明な点が多く、全身炎症性反応症候群に起因する多臓器機能不全症の一部として考えられてきている。最近では新型コロナウイルス感染症から引き起こされるARDSも注目されており、肺炎の悪化による死亡も報告されている。

本研究の位置づけとしては、全身炎症反応に関連するGeneの同定・signaling pathwayの解明および宿主防衛関連因子の注目するGeneおよびTranscriptome factorを同定し、ARDS/ALIの予防・治療を含むSIRSの治療に貢献し、死亡率の減少をもたらすことができるものと考える。さらにARDSの増悪因子とされる喫煙が及ぼす影響を解明し、疾患の予後改善、新型コロナウイルス 感染症におけるARDSの治療確立、および未だ開発されていない同疾患に対する治療効果の向上の一助になることを目的としている。

当初、ヒト気道上皮基底細胞を用いたARDS/COPDモデル、もしくは、Lipopolysaccharide(LPS)誘導ARDSモデルの作成およびCigarette Smoke Extract (CSE)によるCOPDモデルを使用した研究を考えていたが、新型コロナウイルス感染症が世界のみならず本邦でも大流行し、重症コロナウイルス感染症症例の臨床像においてARDSやSIRSを呈する症例が多く、その臨床検体を用いて新型コロナウイルス感染症によるARDS様呼吸器障害に対して、重症度を示すバイオマーカーもしくは、その因子からの革命的な治療につながる可能性を調べることを目的とし、検証を行った。

(対象・研究方法)

対象：2019年2月より2020年12月に横浜市立大学附属病院救急科および横浜市立大学附属市民総合医療センター高度救命救急センターにおいて入院加療を行った中等症および重症新型コロナウイルス感症患者

ここで、重症度分類に関しては厚生労働省の基準に基づく。

方法：対象患者の性別・年齢・既往歴などの患者背景とともに、入院中毎日の血液検査データ・酸素需要・合併症・転機などの臨床情報を解析した。

治療に関しては、現在日本版敗血症ガイドライン2020(J-SSCG2020)で推奨された治療を各患者に行った。全ての臨床データおよび血液検査データが収集可能であったCOVID-19中等症5例、重症COVID-19患者 10例 (ECMO、死亡例を含む) で検討を行った。

1. データ収集方法

臨床検査は、一般的な臨床検査として入院後1日目から14日目までの各時点 (1、2、3、5、7、10、および14日目) で各グループで測定されました。

患者の容態に関しては、Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) およびAPACHEIIスコアに従って評価した。

APACHE IIスコアは1日に評価。SOFAスコアは1日目から14日目まで毎日評価

播種性血管内凝固症候群 (DIC) は、国際学会に基づいて入院中毎日評価

VTEのリスクに関しては、the International Society on Thrombosis and Hemostasis (ISTH) スコアで評価

重度の肥満、癌、整形外科手術、VTEの既往歴など、患者がVTEのリスクが高い場合は、COVID-19群と対照群の両方に予防的未分画ヘパリン (UFH) を使用しました。

2. 採血検体の取り扱い

採血標準的な操作手順を使用して、すべてのサンプルが迅速かつ平等に処理した。

採血は、毎朝留置カテーテルを介して採取され、通常の臨床検査として行った。

ELISAサンプルについては、全血サンプルを直ちに氷上に置き、血液を遠心分離し、血漿を分離し、500 μLに分注し、-80°Cで凍結しました。

血漿シンデカン-1 (SDC-1; Glycocalyxの代謝物) をELISAを用いて2回測定しました。

用いた測定Kitは、human SDC-1 (CD138、Diaclone Cat:950.640.096)

3. 統計分析

中等症グループと重症グループで統計学的評価を行った。

(結果)

患者背景に関しては、発症から入院までの期間以外に有意差はなかった (Figure 1)。

Patient	Severe (n=5)	Critical (n=10)	p-value
Age (year-old; median [IQR])	73 (67-75)	73 (67-78)	0.8537
Gender (Male; %)	40%	70%	0.3266
BMI (median [IQR])	22.8 (22-24)	25.6 (23-28)	0.4990
First Symptom (%)			
dyspnea	40	20	0.6604
fever	75	60	0.5504
cough	20	20	1.0000
others	40	20	0.5604
Smoking History (%)			
never	75	40	0.6094
Admission day after onset (day; median [IQR])	3 (2-3)	7 (5-8)	0.0160
Complications (%)			
Diabetes	40	60	0.6284
Renal Dysfunction	20	10	1.0000
Hemodialysis	20	10	1.0000
Hypertension	40	40	1.0000
Hyperlipidemia	0	10	1.0000
Hyperuricemia	0	20	0.5238
Cardiovascular Disease	20	0	0.6084
Respiratory Disease	75	20	0.2507
Cancer	20	10	1.0000
Collagen Disease	20	0	0.3333
Thrombosis disease	0	0	1.0000
others	2	0	0.0952
APACHEII Score (ois; median [IQR])	5 (5-8)	5 (5-10)	0.2313

*Mann-Whitney U test or Fisher's exact test; IQR; Interquartile range, BMI; Body Mass Index.

通常の血液検査所見においては、白血球数には差が認められなかったものの、CRPに有意差を認め、その他ではLDH・ChEで有意差を認めた。(p<0.05; Data no shown)。

その他、病態の重症度を示すSOFAスコアにおいては挿管している関係もあり、有意差を認めた(p<0.05; Data no shown)。また、血栓兆候を示すスコアである、ISTH scoreに関しても両者で有意差を認めた(p=0.04; Data no shown)

本研究で最も注目しているSDC-1に関しては、正常人および入院時のCOVID-19陰性患者、中等症

COVID-19患者と比較し、重症COVID-19患者のSyndecan-1が増加していることがわかった(Figure 2)。

さらに、入院日から入院後14日までの酸素需要を要する中等症以上の患者の血中Syndecan-1測定を継時的に行ったところ、人工呼吸器管理をする患者のSyndecan-1濃度は要さない患者よりも入院時および継時的経過で有意に増加していることがわかった(Figure 3)。

(成果・考察) 等

本研究では、酸素需要のある入院が必要となる中等症から重症 COVID-19 患者を対象とした臨床研究を行った。特に今回注目したのが COVID-19 で報告されている血栓傾向に対するアプローチを行った。

世界中で COVID-19 に対する治療方針を含めた治療薬の開発が急務であり、日々研究されているが、未だ確立した治療法が存在しない。最近の報告では、この肺病変の主病態は微小血管炎もしくは微小血栓症である可能性があると報告され、COVID-19 で死亡した患者の剖検例においても微小血栓が認められたと報告されている(Maiese A, et al. Forensic Sci Med Pathol. 2020.)。前述した SARS-CoV-2 感染は血栓傾向を呈するという報告から、それに対する低分子ヘパリンを使用した抗凝固療法により COVID-19 の死亡率は低下したと報告されている(Tang N, et al. J Thromb Haemost. 2020;18(5):1094–9.)。この主病変である微小血管炎・血栓の治療確立が COVID-19 の確立した治療法になると想え、血管炎と関与していると考えられる Glycocalyx を評価することで今後の革新的な治療薬の開発につながる可能性が考えられた。そこで、Glycocalyx の構成成分である Syndecan-1(SDC-1)を測定することによってその関連性を検討した。血管炎などにより障害された Glycocalyx は血管から剥がれ落ち、血管透過性亢進などを引き起こし、呼吸障害が悪化する。実際に本研究では、健常人よりも COVID-19 患者、中等症患者よりも重症患者の SDC-1 が有意に増加しており、重症化マーカーとしての役割が示唆された。さらに、入院後の継時的变化でも重症例は有意に SDC-1 の増加を認め、COVID-19 の病態として、血管炎が主病変である可能性・血管炎の遷延が示唆された。

COVID-19 の病変に対する SDC-1, Glycocalyx の関与が確認され、主病変が血管炎が主体となった微小血栓形成の可能性が示唆され、この Glycocalyx の補充および抗血栓治療が重症化および感染後後遺症の軽減につながると考えられた。

本研究をもとに今後の研究を考えると、微小血栓に対する抗凝固療法の効果に対する可能性に加え、微小血管炎に対する抗炎症作用を考慮すると recombinant Thrombomodulin(rTM)投与が未分画ヘパリン持続投与よりも優れている可能性が高いと考える。この根拠は、敗血症による臓器の血管障害には血管内皮表面に存在する糖蛋白である Glycocalyx が関与していると報告されており、平常状態ではこの Glycocalyx が血管内皮の平衡を保っている。敗

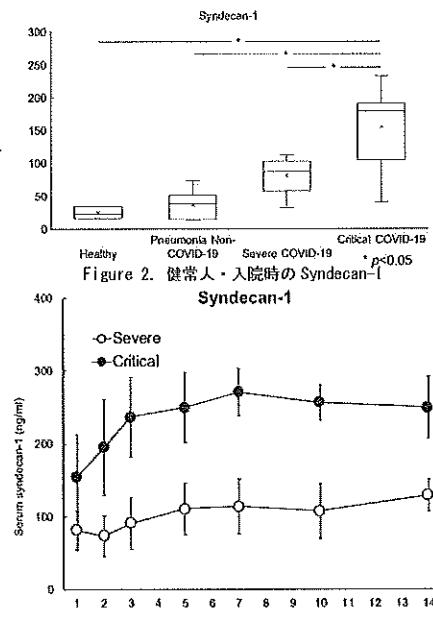


Figure 2. 健常人・入院時の Syndecan-1
*P<0.05

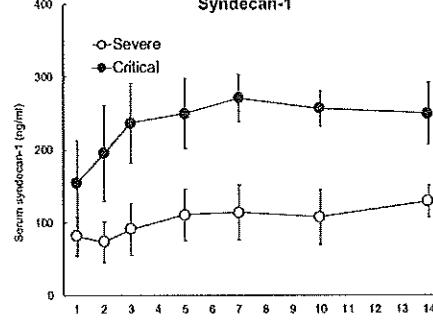


Figure 3. COVID-19 の重症度による血中 Syndecan-1

血症に陥った際、この Glycocalyx が血管内皮表面から剥がれ、それにより血管透過性が破綻し、間質性浮腫や酸素化低下が生じるとされている(Okada H, et al. Crit Care. 2017;21(1):261.; Suzuki K, et al. Am J Pathol. 2019;189(8):1526-35.; Iba T, et al. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 17: 283-294.)。この状況下での rTM 投与は Glycocalyx の脱落を防ぎ、血管透過性を保つことにより酸素化障害や臓器損傷を改善すると報告されている(Suzuki K, et al. Br J Pharmacol. 2020.)。

本研究による成果により解明した COVID-19 の主病態に対する治療により、より多くの COVID-19 患者の予後改善に貢献し、また現在世界中で問題となっている呼吸器症状を主体として COVID-19 後遺症の軽減に繋がると考える(COVID-19 後遺症に関しては本邦でも日本呼吸器学会が中心となり調査中である)。また、今回の研究対象は COVID-19 重症患者であるが、この病態の解明にも繋がり、これに重症化バイオマーカーとの検討(現在当研究室で検証中)により無症候/軽症 COVID-19 患者への投与により重症化を回避できる可能性が考えられる。重症化を回避することが結果的に死亡率を向上し、患者予後に貢献すると考える。もし、この研究に統計学的に優劣がつかなかった場合でも、抗凝固療法が有効であるのか否か、病態解明に繋がると考えられ、今後の COVID-19 治療法の確立に大いに寄与すると考えられる。

現在この成果については、Thrombosis Journal に投稿中であり、間もなく publish されると思われる。

今回の横浜研究振興財団からの助成により本研究が行われ、この成果を世界中を示めすことができたことに深謝致します。

助産師の産後 1か月健診時の メンタルヘルススクリーニング実践と関連要因の検討

横浜市立大学大学院 医学研究科 看護学専攻 母性看護学分野
博士前期課程 2年 小倉 果緒里

(研究目的)

産後のメンタルヘルス不調は、母親の自殺や子どもの虐待、発達の問題につながるため、メンタルヘルス不調の母親を的確に把握することが重要である。その取り組みの一つとして、2017年4月より産婦健康診査事業が開始され、エジンバラ産後うつ病質問票等を用いた、助産師による産後のメンタルヘルススクリーニング（以下 MS）は広く普及している。MSの実施では質問紙の総得点のみで判断するのではなく、母親に寄り添った傾聴と共感を基本姿勢とした面談も含め、母親の心理社会的背景のリスク因子を十分に把握し評価しなければならない（吉田ら、2017）。しかしその実施率が先行し、質問紙の総得点のみでメンタルヘルス状態を評価していることが課題である（厚生労働省、2019；久保、2017）。したがって適切な MS を行う必要があるが、その実態は明らかになっていない。助産師が行う MS の実践とそれに影響を及ぼす要因が明らかになれば、適切な MS に関する有用な示唆が得られる。そこで本研究は、助産師による産後 1か月健診時の褥婦の MS の実態、および関連する個人・組織要因を明らかにすることを目的とした。

(研究方法)

- 1) 対象：核家族や育児困難感を抱える母親が多く（総務省統計局、2018；山口ら、2007），特に MS の必要性がある首都圏、主要都市の病院や診療所、助産所に勤務する助産師 1052 名。
- 2) データ収集方法・内容：データ収集は郵送法で、対象施設の看護管理者宛に質問紙を郵送し、対象となる助産師を 1名推薦し質問紙を渡してもらった。質問紙投函は回答後、直接研究参加者にしてもらった。データ収集内容は、質問票を用いた適切な MS の実践状況（十分な面談や総体的評価、質問紙記入時の配慮等）、および関連する個人・組織属性である。
- 3) 分析方法：統計解析ソフト SPSS version27.0 を使用し、各質問項目の基本統計量の算出、探索的因子分析、Mann-Whitney の U 検定を用いた 2 群比較、ロジスティック回帰分析を実施した。統計学的有意水準は $p < 0.05$ とした。
- 4) 倫理的配慮：本研究は、横浜市立大学医学研究倫理審査委員会の承認を得て実施した（承認番号：A191200012）。

(結果)

1052 施設に質問紙を郵送し、有効回答 207 施設（有効回答率 84.2%）を分析対象とした。

1. 対象者の背景

回答者の助産師経験年数は平均 17.81 ($SD=8.03$) 年、MS 経験年数 5.07 ($SD=5.96$) 年で、年代別では 40 歳台が 83 名 (40.1%)、職位はスタッフが 124 名 (59.9%) と最も多かった。施設の年間分娩件数は平均 482.39 ($SD=425.80$) 件、産科外来スタッフ数/日 6.68 ($SD=9.93$) 人、MS スタッフ数/日 1.86 ($SD=1.53$) 人、施設種別は病院が 115 施設 (55.6%) と最も多かった。

2. MS 実践の現状

1) MS 実践の構成因子の確認

23 項目の探索的因子分析を行い、3 因子 16 項目が抽出された。因子名は第 1 因子【感情表出を促す関り】、第 2 因子【率直な回答を導く配慮】、第 3 因子【適切な対応の認識】と命名した。各因子に対する Cronbach α 係数は $\alpha = 0.725 \sim 0.801$ を示し、項目全体で $\alpha = 0.808$ であった。

2) MS 実践評価高低群における MS 実践内容の比較（表 1）

第 1 因子【感情表出を促す関り】全 7 項目、第 2 因子【率直な回答を導く配慮】全 6 項目において、実践評価高群は低群と比較し、実践得点が有意に高かった($p < 0.001$)。

表 1 メンタルヘルススクリーニング実践評価高低群における実践内容の比較

N=175

	MS 実践評価高群 (n=95)	MS 実践評価低群 (n=80)	p 値
	中央値	中央値	
第 1 因子：感情表出を促す関り	28	26	< 0.001
第 2 因子：率直な回答を導く配慮	23	18	< 0.001
第 3 因子：適切な対応の認識	9	9	0.48

3. 母親のメンタルヘルスのアセスメント視点の実施状況

1) 母親のメンタルヘルスのアセスメント視点の構成因子の確認

43 項目の探索的因子分析を行い、4 因子 31 項目が抽出された。因子名は第 1 因子【育児困難感の要因】、第 2 因子【家族関係の変化】、第 3 因子【否定的思考になりやすい特性と生活の乱れ】、第 4 因子【症状の出現】と命名した。各因子に対する Cronbach α 係数は $\alpha = 0.685 \sim 0.904$ を示し、項目全体で $\alpha = 0.932$ であった。

2) MS 実践評価高低群における母親のメンタルヘルスのアセスメント視点の比較（表 2）

第 1 因子【育児困難感の要因】12 項目($p < 0.001$)、第 2 因子【家族関係の変化】4 項目($p = 0.002$)、第 3 因子【否定的思考になりやすい特性と生活の乱れ】5 項目($p < 0.001$)において、MS 実践評価高群は低群と比較し、得点が有意に高かった。

表 2 メンタルヘルススクリーニング実践評価高低群における

母親のメンタルヘルスのアセスメント視点の比較

N=175

	MS 実践評価高群 ^{a)}		MS 実践評価低群 ^{b)}		p 値
	n	中央値	n	中央値	
第 1 因子：育児困難感の要因	93	47	78	42.5	< 0.001
第 2 因子：家族関係の悪さ	95	32	77	30	0.002
第 3 因子：否定的思考になりやすい特性と 生活の乱れ	92	24	79	23	< 0.001
第 4 因子：症状の出現	94	16	80	16	0.13

^{a)}メンタルヘルススクリーニング実践評価高群（中央値79点以上）、^{b)}低群（中央値79点未満）

4. MS 実践に影響を及ぼす個人・組織要因（表 3）

個人要因では MS の知識高得点群(オッズ比:以下 OR=4.537, 95%信頼区間:以下 95%CI=2.13-

9.65, p 値 : 以下 $p < 0.001$), 職務充実感高得点群(OR=3.185, 95%CI=1.41-7.15, $p = 0.005$), 母親のメンタルヘルスのアセスメント視点高得点群(OR=2.436, 95%CI=1.13-5.22, $p = 0.02$)の 3 変数が, 組織要因では育児支援チェックリスト使用あり群(OR=3.318, 95%CI=1.46-7.50, $p = 0.004$), MS の教育的サポートあり群(OR=2.799, 95%CI=1.35-5.78, $p = 0.005$), 組織風土高得点群(OR=2.114, 95%CI=1.05-4.24, $p = 0.03$)の 3 変数が関連していた。

表3 メンタルヘルススクリーニング実践に関連する個人・組織要因

変数	p 値 (p)	オッズ比 (Exp ^a)	95%信頼区間 (下限ー上限)	変数	p 値 (p)	オッズ比 (Exp ^a)	95%信頼区間 (下限ー上限)
【個人要因】(n=144)				【組織要因】(n=155)			
メンタルヘルススクリーニングの知識 ^{b)}				育児支援チェックリスト			
22点未満		1		なし		1	
22点以上	<0.001	4.537	2.13-9.65	あり	0.004	3.318	1.46-7.50
職務充実感 ^{b)}				教育的サポート			
19点未満		1		なし		1	
19点以上	0.005	3.185	1.41-7.15	あり	0.005	2.799	1.35-5.78
母親のメンタルヘルスのアセスメント視点 ^{b)}				組織風土 ^{b)}			
159点未満		1		23点未満		1	
159点以上	0.02	2.436	1.13-5.22	23点以上	0.03	2.114	1.05-4.24

ロジスティック回帰分析 (尤度比 : 変数増加法), モデル χ^2 検定 : $p < 0.001$

Hosmer-Lemeshow の検定 : 個人要因 $p=0.554$; 組織要因 $p=0.847$

判別的中率 : 個人要因 75.0%; 組織要因 66.5%

^{a)}各変数の最初のカテゴリーを 1 としたときのオッズ比

^{b)}メンタルヘルススクリーニングの知識、アセスメント視点、職務充実感、組織風土得点は中央値で分割

(考察)

1. MS 実践評価高低群における MS 実践内容と母親のメンタルヘルスのアセスメント視点

MS 実践評価が高い助産師は、母親がありのままの思いを表し出できるような【感情表出を促す関り】や、母親への気遣いや環境の配慮である【率直な回答を導く配慮】の MS 実践評価が高く、さらに【育児困難感の要因】、【家族関係の変化】、【否定的思考になりやすい特性と生活の乱れ】の母親のメンタルヘルスのアセスメント視点評価も高かった。このことから MS 実践評価が高い助産師は、母親がありのままの思いを表し出しあり、回答できるような十分な配慮も含めた関りができることで、母親の率直な思いを引き出すことができ、その結果、具体的かつ広い視点で母親のメンタルヘルスのアセスメントにつなげることができていることが推察できる。すなわち適切な MS 実践には、母親のメンタルヘルスのアセスメントの実施が関連するため、具体的な内容にも着目した上で、適切に双方の視点を持って実施することの必要性が示唆された。さらに【率直な回答を導く配慮】の MS 実践、および【育児困難感の要因】のアセスメント視点の実践評価高低群の得点差より、特にこれらの内容強化を図っていくことが適切な MS 実践につながることが考えられた。

2. MS 実践に影響を及ぼす個人・組織要因

適切な MS に関する知識や母親のメンタルヘルスのアセスメント視点が多く、職務充実感が高い助産師ほど、MS 実践評価が高いことが明らかとなった。知識の多さについて、対象にとつて安全な質の高い医療やケアを提供するために、専門的知識や経験、判断、継続的な学習が重要

であり (Benner et al., 2008), 繼続的な学習により MS の知識を深め、さらに MS 経験を積み重ねることで、学んだ知識を実践に活かせるよう定着、浸透させていくことが重要であると考える。次にアセスメント視点の多さについて、山中ら (2020) はアセスメント実施レベルに評価指標の活用やその使用頻度、専門家への相談との関連を報告している。質問票を MS 実践の評価指標として十分活用するために、その使用法も含めたアセスメント教育の充実や、実践での活用が必要と考える。さらに専門家へ相談し、スーパーバイズが得られる環境の整備等、専門家からのサポート体制を整えていくことも重要であると考える。職務充実感の高さについて、妊娠期から産褥期に渡り MS 実践の役割を担い、産後 1 か月以降の支援の必要性や方法について、慎重に判断しなければならない助産師の責任は重く、その精神的負担は大きいことが考えられる。田代ら (2020) はやりがいや充実感等を持ってケアするには、自身の関わりを振り返り、スタッフ同士が認め、褒め合う機会を作る必要性を述べている。定期的に MS を実践する助産師間で振り返りの実施や、互いの思いが共有できる機会等を設け、スタッフ相互の精神的サポート体制を構築していく必要があると考える。

3. MS 実践に影響を及ぼす組織要因

育児支援チェックリストを使用し、MS の充実した教育的サポートがあり、良好な人間関係が構築された組織風土の施設に属する助産師ほど、MS 実践評価が高いことが明らかになった。本研究では育児支援チェックリスト使用者の多くが EPDS、赤ちゃんへの気持ち質問票の 3 つの質問票を併用していたが全体の 3 割に満たなかった。現状は公費補助があるがゆえの MS 開始による、現場の MS 認識の不十分さにより、3 つの質問票併用の意義の認識も不足し、併用が定着していないことが推察される。よって組織のこれら 3 つの質問票併用のメリットの十分な理解と、導入の検討が必要であると考える。次に MS の教育的サポートについて、実施している施設は 6 割であり、学習機会への参加に関するサポートが十分充実しているとは言えない現状であった。学習経験がある方が看護実践力が高いことが報告されているが (川本他, 2017), 助産師の継続教育における課題として、病棟内での指導力や能力の開発、向上に向けた研修内容、院外研修活用の不十分さ (青柳他, 2012 ; 唐沢他, 2017) が指摘されている。よって個々の助産師の MS 実践上の課題やニーズに合わせた教育を充実させるために、必要時院外研修等の外部資源が十分に活用できるシステムの構築や、個々が院外研修で獲得した知識を組織へ還元し、組織全体としての MS 実践能力向上につなげていく必要があると考える。良好な組織風土について、人間関係やチームワークが良好な組織風土であると評価している者は 6 割に満たなかった。組織の良好な関係性の強化に影響を及ぼす要因として、組織間における十分な意見交換や、他者の考えを尊重した上での、自己決定能力の重要性が報告されており (Laschinger et al., 2009), 看護スタッフ間はもちろん、多職種とも互いの専門性を生かした意見を尊重した上での話し合いを通し、組織全体で協力して施設の MS 体制を整備、充実させていくことが重要であると考える。

(学会発表・学会誌投稿)

- ・小倉果緒里、飯田真理子、竹内翔子、篠原枝里子、中村幸代. 助産師による産後 1 か月健診時の褥婦の MS の実践と関連要因の検討. 第 35 回日本助産学会学術集会, 2021 年 3 月.
- ・小倉果緒里、飯田真理子、竹内翔子、篠原枝里子、中村幸代 (査読中). 助産師の産後 1 か月健診時の MS の実践と関連要因の検討. 母性衛生.

体格がフェンタニルの血中移行にもたらす影響 -皮膚組織におけるP-gp発現量解析と 薬物動態・薬効評価用モデルマウスの検討-

横浜市立大学大学院医学研究科看護学専攻看護生命科学分野
博士前期課程2年 高橋 里歩

(研究目的)

強オピオイド鎮痛薬であるフェンタニル貼付剤は、使用が簡便で嚥下困難な患者にも投与可能といった利点があるが、重大な副作用も生じうることから慎重な投与が望まれる。本邦では初回投与量を換算表に基づき決定し、鎮痛効果に応じて調整する。しかし、フェンタニル貼付剤の薬剤応答性は個体差が大きく、安定した鎮痛効果を得るまでの用量調整は容易ではないといった問題や(Solassol et al., 2005)、安全性を重視した換算値に基づいて切り替えを行った場合でも、疼痛コントロールが不良になる症例や有害作用が出現する症例があるなど(内藤ら, 2015)、課題も挙げられている。投与量調整には使用者の体格は考慮されないが、貼付剤からのフェンタニルの血中移行にBody Mass Index(BMI)が影響することが報告されている(Heiskanen et al., 2009)。一方で、貼付剤からフェンタニルの血中移行にBMIは影響しないという報告もあり(Kuip et al., 2018)、統一した見解は得られていない。

フェンタニルを基質とする薬物トランスポーター P-glycoprotein(P-gp/MDR1)は、真皮の血管内皮細胞に局在し、薬物の吸収に寄与することがマウスで示されている(Ito et al., 2008; Hashimoto et al., 2013)。そのため、貼付剤から血中へのフェンタニルの移行に、皮膚中のP-gpが関与しているのではないかと考えた。P-gpは炎症性サイトカインにより増加または低下することが報告されている(Sukhai et al., 2001; Lee et al., 2012; Jing et al., 2018)。全身性の慢性炎症状態である肥満では、皮膚においても炎症性サイトカインが増加することによりP-gp発現量が増加または低下する可能性があると考えた。

本研究では薬物の血中への移行に働きフェンタニルを基質とする薬物トランスポーター P-gpに着目し、BMIとの関連について明らかにするためにヒト皮膚組織を使用して以下の2点の解析を実施した。

- (1) P-gpをコードする遺伝子 $MDR1$ のmRNA発現量を定量し、BMIとの関連について解析する。
- (2) P-gpの発現を変動させることができると報告されている炎症性サイトカインTumor Necrosis Factor- α (TNF- α)、Interleukin-6(IL-6)のmRNA発現量を定量し、BMIとの関連について解析する。

得られた結果は、体格を考慮したフェンタニル貼付剤の投与量調整において重要な知見の一つとなると考える。

(研究方法)

1. 対象者

A病院にて腹直筋皮弁法による乳房再建術を受けた日本人女性85名を対象とし、手術

時に生じる腹部の余剰皮膚組織を解析した。対象者の基本属性は電子カルテから収集し、手術前日のBMIを体格の指標として使用した。なお、スピロノラクトン・タモキシフェン・ドキソルビシンはヒトまたは動物の正常組織・細胞においてP-gp発現誘導を引き起こすことが報告されているため、これら3剤の使用歴についても情報収集を行った。除外基準として、1)全身性皮膚疾患・糖尿病・感染症を有する者、2)スピロノラクトン・タモキシフェン・ドキソルビシンの使用歴のある者のうち、乳がん切除を同時に行う一次再建を受けた者、3)除外基準に関する情報が電子カルテから収集できなかつた者、を設定した。

2. 分子生物学的解析

申請者のこれまでの研究で、ヒト皮膚組織におけるP-gpの局在が真皮層において確認できているため、本研究では真皮層を解析部位とした。解析の手順としては、採取した皮膚から皮下脂肪組織を取り除いた後、2U/mLのディスパーゼ溶液(ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA)に4°Cで一晩浸漬し、表皮と真皮を剥離後、RNA抽出まで-85°Cで保存した。真皮からRNAを抽出し、cDNA合成を行つた。合成したcDNAを使用して、真皮の*MDR1*、*TNF-α*、*IL-6*、内部標準遺伝子*18S*のmRNA発現量をRT-qPCR法により定量した。

3. 統計解析

統計解析ソフトIBM SPSS Statistics ver. 24.0(IBM, NY, USA)を用い、統計解析を行つた。Shapiro-Wilk検定を用いて正規性を確認した後、2変量の相関関係には Spearmanの順位相関分析、2群間比較にはMann-WhitneyのU検定を用いて解析した。統計学的有意水準は $p < 0.05$ とした。

4. 倫理的配慮

本研究は本学ヒトゲノム・遺伝子研究等倫理委員会の承認(承認番号:A200300013)を得て実施した。

(結 果)

1. 対象者の基本属性

本研究の対象者85名の基本属性を表1に示した。対象者の年齢は52.0±5.9(40-68)歳、BMIは22.5±2.8(18.3-34.7)kg/m²であった。対象者の中にスピロノラクトン使用歴のある者は含まれていなかつたが、タモキシフェンは44名(52%)、ドキソルビシンは8名(9%)が使用していた。ドキソルビシン使用歴のある対象者8名のBMIに偏りは認められなかつた。

表 1. 対象者の基本属性

	平均±標準偏差 (最小値-最大値); n (%)	V=85
年齢(歳)	52.0±5.9(40-68)	
BMI(kg/m ²)	22.5±2.8(18.3-34.7)	
スピロノラクトン使用歴のある者	0(0)	
タモキシフェン使用歴のある者	44(52)	
ドキソルビシン使用歴のある者	8(9)	

2. 分子生物学的解析

2.1. BMIと真皮におけるMDR1 mRNA発現量の相関分析

BMIとMDR1 mRNA発現量の相関関係を図1に示した。BMIとMDR1 mRNA発現量との間に有意な弱い負の相関関係が認められた(Spearman's $\rho = -0.224$, $p = 0.039$)。なお、タモキシフェン使用歴の有無の2群間でMDR1 mRNA発現量を比較した場合において有意な差は認められなかった($p = 0.778$)。

2.2. BMIと真皮におけるTNF- α およびIL-6 mRNA発現量の相関分析

BMIと真皮におけるTNF- α およびIL-6 mRNA発現量の相関関係を表2に示した。BMIと各炎症性サイトカインとの関連に関して、TNF- α mRNA発現量においては有意な相関関係は認められず(Spearman's $\rho = -0.150$, $p = 0.171$)、IL-6 mRNA発現量においては有意な弱い負の相関関係が認められた(Spearman's $\rho = -0.220$, $p = 0.043$)。

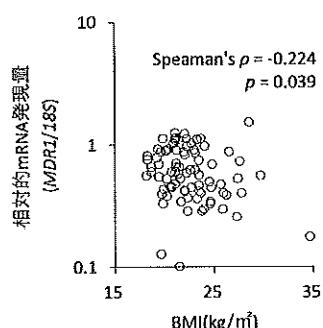


図1. BMIと真皮におけるMDR1 mRNA発現量の相関分析

(成果・考察) 等

本研究は、薬物の血中への移行に働きフェンタニルを基質とする薬物トランスポーターP-gpに着目し、BMIとの関連について明らかにするためにヒト皮膚組織の真皮層を解析した。

本研究の対象者には、ヒトまたは動物の正常組織・細胞においてP-gp発現誘導を引き起こすことが報告されている薬剤のうち、タモキシフェン・ドキソルビシンの使用歴のある者が含まれていた。そのため本研究の対象者において、これらの使用歴がMDR1 mRNA発現量の解析結果に影響したかについて考察した。本研究では、乳房再建術の直前までタモキシフェンまたはドキソルビシンを使用していた可能性のある一次再建の対象者を除外した。また、過去のタモキシフェン使用歴については、使用の有無の2群でMDR1 mRNA発現量に有意な差は認められなかった($p = 0.778$)。ドキソルビシン使用歴のある対象者は8名と少ないため、使用の有無の2群でMDR1 mRNA発現量に差があったか統計学的に示すことはできない。しかし、ドキソルビシン使用歴のある対象者のBMIに偏りは認められなかった。これらのことより、過去の使用歴はBMIとMDR1 mRNA発現量の関連を解析する際の交絡因子にはならないと考える。

本研究において、BMIと真皮のMDR1 mRNA発現量の間に有意な負の相関関係が示されたことから、BMIの増加に伴いP-gpが減少することによりフェンタニルの血中移行は低下する可能

表2. BMIと真皮におけるTNF- α およびIL-6 mRNA発現量の相関分析

遺伝子名	Spearman's ρ	p
TNF- α	-0.150	0.171
IL-6	-0.220	0.043

性が考えられる。しかし、フェンタニル貼付剤使用時に薬物の血中移行を検証した先行研究では、普通体重の患者と比較して、BMIが低い悪液質の患者でフェンタニルの血中移行は有意に低下したことや(Heiskanen et al., 2009)、BMIとフェンタニルの血中移行の間に関連は認められなかつたことが報告されているが(Kuip et al., 2018)、BMIの増加によるフェンタニル血中移行の低下を示した報告はない。本研究では真皮層の*MDR1* mRNA発現量を解析したが、P-gpは細胞膜上と細胞質内に局在し、P-gpが活性を示すには細胞膜上に局在する必要がある (Kawase et al., 2019)。そのため、今後はBMIと細胞膜上に局在するP-gpタンパク発現量との関連について解析することで、貼付剤からのフェンタニルの血中移行を制御しうるP-gpとBMIの関連についてさらに明らかにしていく。

P-gpは、肝臓・小腸・腎臓・脳などのあらゆる組織においても発現が認められている。体格とP-gp発現量の関連について解析した先行研究では、やせ型ラットと比較し肥満ラットの小腸におけるP-gpタンパク発現量は有意に低下することが示されている(Sawamoto et al., 2014)。ヒトでは、BMIの増加に伴い脳組織における*MDR1* mRNA発現量は有意に低下することが報告されている(Vendelbo et al., 2018)。本研究では、BMIと真皮の*MDR1* mRNA発現量との間に有意な弱い負の相関関係が認められた。このことから、P-gpが発現する複数の臓器において、BMIの増加が*MDR1* mRNA発現量を低下させる可能性があると考えた。

次に、BMIの増加が真皮の*MDR1* mRNA発現量を低下させた要因として、P-gpの発現を変動させることが報告されている炎症性サイトカインが関与していると予測し(Sukhai et al., 2012; Lee et al., 2012; Jing et al., 2018)、解析を実施した。先行研究では、肥満により皮下脂肪組織におけるTNF- α とIL-6が増加することが報告されている(菅波ら, 2012; Sindhu et al., 2015)。さらに、TNF- α とIL-6はP-gpの発現変動に関与する(Sukhai et al., 2012; Lee et al., 2012; Jing et al., 2018)。本研究では真皮局所における炎症を評価するために、真皮のTNF- α , IL-6 mRNA発現量を解析した。その結果、BMIとTNF- α mRNA発現量においては有意な相関関係は認められず、IL-6 mRNA発現量においては有意な弱い負の相関関係が認められた。本研究の結果から、皮下脂肪組織とは異なり、真皮ではBMIの増加によるTNF- α およびIL-6の転写の亢進は生じていない可能性が考えられた。また、本研究の対象者のBMIは22.5±2.8kg/m²であり、日本人に特徴的な軽度の肥満であったため、BMIの増加に伴うTNF- α , IL-6の増加が認められなかつた可能性も考えられる。本研究の対象者の炎症状態について評価するためには、真皮におけるTNF- α , IL-6のタンパクレベルでの解析や、皮下脂肪組織の解析も必要である。

P-gpとBMIの関連について明らかになった後には、フェンタニルの血中移行及び鎮痛効果に与える影響について動物実験により個体レベルで検証する必要がある。そのため、体格の異なるモデルマウスを複数用いて皮膚組織中のP-gp発現量を解析し、日本人女性の皮膚組織中のP-gp発現量を解析した本研究の結果を反映する薬物動態・薬効評価用マウスの確立を目指す。

(学会発表)

・高橋里歩, 横原弘子, 赤瀬智子: ヒト皮膚組織における P-glycoprotein (P-gp) と TNF- α 遺伝子発現量の解析 -BMI との関連に着目して-, 日本薬学会第141年会, 広島, 2021年3月.

患者由来がんオルガノイドを用いた 体外薬剤感受性評価システムの構築

横浜市立大学附属病院 がんゲノム診断科 講師
加藤 真吾

(研究目的)

本研究の目的は、がんゲノム検査の結果から新たな治療法が提示される患者の数を増加させることである。2019年6月、がんにおける遺伝子異常を解析し、この情報を元に標準治療以外の治療法の選択肢を検索する『がんゲノム検査』が本邦で保険承認された。臓器の枠を超えた新しい視点から治療法の検索が可能になる検査として期待されているが、現状では新たな治療法が検出される割合が約10%と限定的なことが課題である。がんゲノム検査が一般臨床にも用いられるようになった今、検査の結果治療へ結びつけることが出来る症例（薬剤検出症例）を少しでも増やすことは、社会的要請が極めて強い課題である。

薬剤検出症例が限定的な原因の一つに、意義不明遺伝子変異の存在が挙げられる。がんゲノム検査において、遺伝子変異と対応薬剤は、通常変異の型まで限定されている。即ち、Aという遺伝子に対応薬剤Xが存在する場合、通常は遺伝子Aの特定の変異パターンにのみXは『適合』となる。このため、患者のがんにおいて、遺伝子Aに変異が認められた場合でも、この変異パターンでなければ、薬剤Xは推奨薬剤として報告されない。このような『変異のある遺伝子自体に対応薬剤は存在するものの、変異の型の違いにより、薬剤検出症例に該当しない』というケースは、実際のがんゲノム検査の現場で起きている事例である。

本研究では、患者由来がんオルガノイドという技術を用いて、体外的に適合薬剤の感受性を評価するシステムの構築を目指す。このシステムの構築により、がんゲノム検査では出来ない新たな情報を付加し、薬剤検出症例の増加を目指す。

(研究方法)

本研究のフローを以下に示す(図1)。まず、がんゲノム検査を受ける予定の患者の内、組織採取を行う患者に対して、採取した組織からがんオルガノイドを樹立する(図2)。がんゲノム検査が終了するまで、

このがんオルガノイドは一時保存しておく。がんゲノム検査の結果、遺伝子変異に対応する薬剤が検出され、かつ、がんゲノム検査のみでは薬剤推奨度が十分でない症例を本研究の対象とする(次ページ表1、患者3)。

まず、対象症例のがんオルガノイドからゲノムDNAを抽出し、がんゲノム検査で得られた結果の遺伝子変異領域をサン

図 1.

- ①患者由来がんオルガノイドを樹立
- ②がんゲノム検査の結果により対象症例を選択
- ③がんオルガノイドの遺伝子変異が、
患者のがんゲノム検査結果と一致しているかを確認
- ④in vitro/in vivoの薬剤感受性試験

図 2.

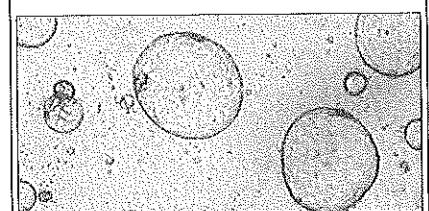


表 1.

患者	患者のがんに変異が認められた遺伝子	該当薬剤	薬剤に適合する変異	患者のがんに認められた変異	症例の除外/登録
患者1	遺伝子B	なし	該当なし	変異Ba	解析対象薬剤がないため除外
患者2	遺伝子A	薬剤X	変異Aa、Ab、Ac、Ad	変異Aa	がんゲノム検査のみで薬剤Xが推奨されるため除外
患者3	遺伝子A	薬剤X	変異Aa、Ab、Ac、Ad	変異Ae	がんゲノム検査のみで薬剤Xが推奨されないが、解析対象薬剤があるため解析対象として登録

ガーサークエンスにより、複数点確認する。次に、*in vitro*で対応薬剤の感受性を評価する。解析は、CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega)を用いて、細胞増殖試験を行う。最後に、T細胞欠損マウス(RAGノックアウトマウス)を用いて皮下腫瘍を作成し、対応薬剤を投与することで、*in vivo*での薬剤感受性試験を行う。

(結 果)

実際に解析が完了した症例を具体例として報告する。患者は非切除の胃癌患者で、がんゲノム検査を受けるために組織採取を行った。その際にオルガノイドを樹立し(図3)、一度凍結した。

検査の結果、mTOR経路の上流調節因子であるSTK-11と呼ばれる遺伝子に異常が見つかった

が、variantが意義不明であるために、東京大学のエキスパートパネルでは、対応薬剤(エベロリムス)は推奨できないと結論付けられた。

その後、本患者由来のがんオルガノイドを凍結より解凍し、エベロリムスに対する感受性を*in vitro*で解析した(図4)。その結果、 $IC_{50} < 1\mu M$ と、既報の細胞株の IC_{50} (5~20)に比較して極めて低い値で増殖が抑制された。この結果だけを元に、エベロリムスの感受性が

図 3. 患者由来胃癌オルガノイド

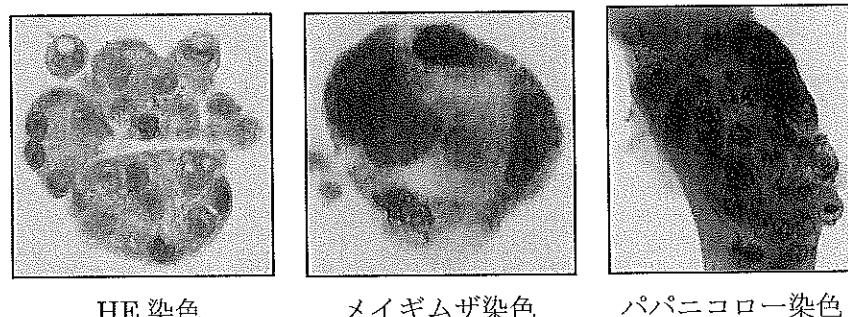
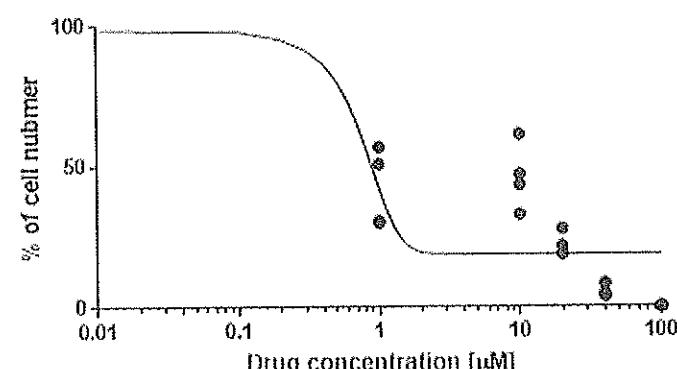


図 4. 患者由来オルガノイドの薬剤感受性解析



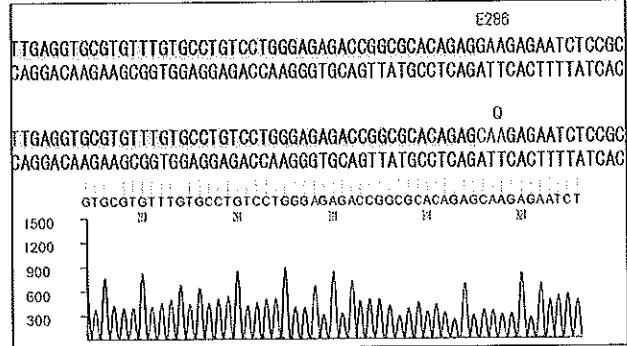
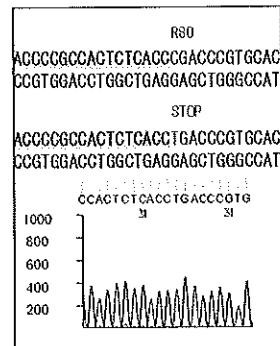
あるか、ということは断定できないため、現在 *in vivo* での薬剤感受性を検討している。

本症例では、意義不明の遺伝子変異に対応薬剤が存在したため、まずその薬剤に対する感受性を確認した。その後、オリジナルのがんの性質を反映しているかの妥当性を評価するため、検査で得

図 5. 患者由来がんオルガノイドの遺伝子変異解析

CDKN2A R80*

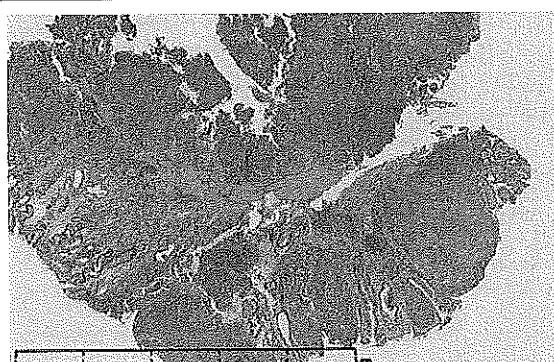
TP53 E286Q



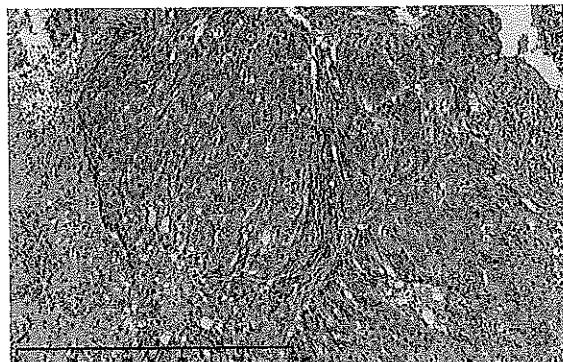
※上段:正常の配列、下段:がんオルガノイドの配列

られた遺伝子変異を 2 点確認した（図 5）。ただし、STK-11 は広範な deletion であったので、現在のところ解析できていない。*In vivo* における腫瘍形成能を確認するため、RAG ノックアウトマウス（T 細胞、B 細胞欠損マウス）の皮下に患者由来がんオルガノイドを移植した。移植後 4 週間で、腫瘍を形成した（n=5/5、腫瘍形成率 100%）。形成された皮下腫瘍は、オリジナルの腫瘍に類似した、低分化～中分化の腺癌の病理像を呈した（図 6）。現在、この腫瘍に対するエベロリムスの投与を計画している。

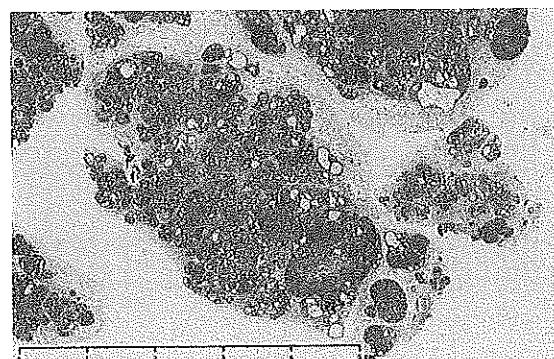
図 6. HE 所見



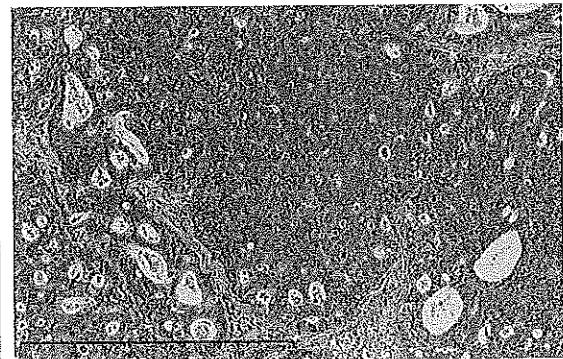
オリジナルの腫瘍（弱拡）



オリジナルの腫瘍（強拡）



がんオルガノイドが形成した皮下腫瘍（弱拡）



がんオルガノイドが形成した皮下腫瘍（強拡）

(成果・考察) 等

がんゲノム検査の普及に伴い、意義不明変異の機能評価を行う系の必要性が増したといえる。

臨床がんゲノム検査では、データベース上に情報が存在する変異以外は、患者にとって『有益な』情報とはならない(図7)。臨床がんゲノム検査は、進行がん患者が最後の希望を託して受ける検査であるため、得られた解析結果から出来る限りの情報を拾い上げることが重要である。

また、本研究の拡張性として、樹立した患者由来オルガノイドを、他の解析に応用することもできる。本研究では、患者本人のがん由来オルガノイドを自身の検査結果の解釈に用いるものであるが、実際にはがん

図7.

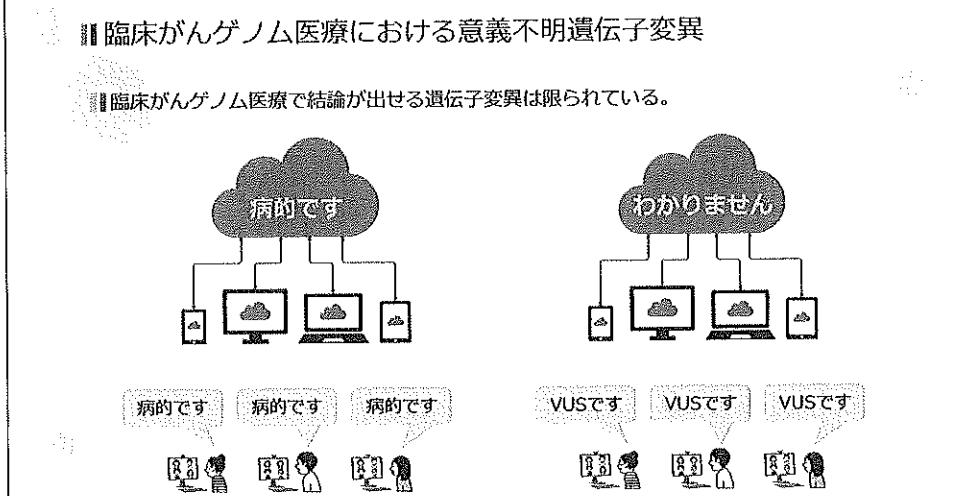


図8.

■ 解析ツールとして患者由来がんオルガノイドの有用性

■ ヒト正常組織オルガノイドと、がん組織オルガノイドの比較

	ヒト正常組織オルガノイド	ヒトがん組織オルガノイド
維持コスト	特に高額なwntシグナル系の増殖因子が必要な場合がほとんどであり、培養液が40mlで10万円近くなる。	wntシグナル系の増殖因子を除いても維持可能な場合が多く、培養液の金額は正常組織オルガノイドの1/5～1/10程度に下げられる。
遺伝子変異導入後	シングルセルクローニングの負荷に耐えられず、培養できない場合が多い。	シングルセルクローニングの負荷に元々耐えられる場合が多い。
遺伝子変異解析	正常ゲノムを持つと考えられ、解析可能であれば結果は信頼性が高い。	元から遺伝子変異を持つため、それを踏まえて解析ツールとして適正な場合は結果は信頼性が高い。

当院では、現実的に解析可能ながん組織オルガノイドを用いて解析を進めている。

ゲノム検査用の組織採取を予定していない患者が大部分である。この場合、自分のがんのアバターとしてのがんオルガノイドは作成できない。このような場合、正常組織から樹立したオルガノイドに *in vitro* で遺伝子改変を行い、解析に用いるという選択肢が考えられる。しかし、ヒト正常組織オルガノイドは、維持培養するためのコストが高額であり現実的ではない(図8)。一方、がん組織オルガノイドは、細胞自身の増殖能が高く、維持コストも比較的安価となる。このため、今後多くの患者由来がんオルガノイドを樹立し、ライブラリとして保存しておくことで、より幅広い患者、遺伝子変異に対応した体外薬剤感受性評価システムが構築可能であると期待される。

精神科医師・看護師を対象とした LGBT (Lesbian, Gay, Bisexual, Transgender)への診療態度 の現状とそれに与える影響因子の検討

横浜市立大学大学院医学研究科医科学専攻博士課程
早川 麻耶

(研究目的)

2011年、国連人権理事会は、性的指向や性別自認を理由とした暴力や差別について「重大な懸念」を表明した決議を採択した。2012年には、当時国連人権高等弁務官のナビ・ピレイによりLGBT人権宣言が刊行された。そこでは、LGBTの人々の人権の保護に関してLGBTに対する嫌悪や偏見、嘲笑、差別などからの被害を防ぐ、または禁止することが明記されている。一方で、LGBTへの偏見や差別は依然としてなくならず、LGBTは異性愛者からのいじめや暴力被害に遭っていると言われている(Clements-Nolle et al., 2006, Katz-Wise and Hyde, 2012)。

日本において人口統計学的なデータは少なく、2017年に岩手県のランダムに抽出した高校生8,769名を対象として性に関する調査をした結果、10.1%がLGBTであったと報告している(佐藤 et al., 2017)。LGBTは不特定多数のセックスパートナーを持ち、肝炎や梅毒、HIVなどの感染症のリスクが高く、検診率が低いために癌化するリスクも高いと言われている(Herbst et al., 2008, Scheer and Antebi-Gruszka, 2019)。さらに、うつ病や不安障害、アルコール、薬物などの物質使用障害など、精神疾患に罹患する割合も高く、自傷行為や自殺未遂、自殺に至る割合も異性愛者に比べ高いことが明らかとなっている(Hidaka et al., 2008, Mereish et al., 2014)。つまり、LGBTの医療ニーズは高く、日常の医療の場面でもLGBTの患者は珍しくないと考えられる。しかしながら、多くの先行研究で、LGBTは医療ニーズがあるにも関わらず適切な医療を受けられない可能性が指摘されている(Smith and Mathews, 2007, Kitts, 2010)。LGBTは医療従事者による差別的な発言や配慮の欠如から必要な検査や診察が受けられず、異性愛者に比べて医療格差が生じているのである。

一方で、多くのLGBTを含むHIV感染者のセクシュアルヘルスへ直接支援を行う医療従事者でも、支援に対する戸惑いや自信のなさがあることが分かっている。臨床心理士に対する調査では、ホモフォビアが臨床態度に影響を与えることが示唆されている(品川, 2006)。ホモフォビアとは、LGBTを嫌悪する感情や態度であり、診療実践に影響を与えることが予想される。海外の既存の研究は、医療従事者のLGBTに関する知識の程度とLGBTへの態度を問うものが主であり、それらと診療実践との関連を検討したものは見当たらない。

本研究では、児童精神及び精神科救急に携わる医師看護師を対象に、LGBTに対する肯定的な臨床実践を明らかにし、知識や態度、臨床準備状態との関連を検討することを目的とした。本研究では、医療従事者を対象に、LGBTの健康問題に関する知識と、ホモフォビアの程度を明らかにし、診療やケア提供時の態度にどのような影響を与えるのかを明らかにすることとする。これらを明らかにすることで、医療従事者への教育を見直し、LGBT患者

を包括的にケアできる医療体制を提供できる可能性がある。

(研究方法)

研究対象：日本児童青年精神医学会、日本精神科救急学会に所属している医師、看護師とする。

質問内容：対象者の基本属性（年齢、職種、精神科従事歴など）のほか、LGBTへの肯定的な臨床実践はThe Gay Affirmative Practice Scale (GAP)を、知識や態度、臨床準備状態はThe Lesbian, Gay, Bisexual, and Transgender Development of Clinical Skills Scale (LGBT-DOCSS)を使用し、いずれも5件法を用いた。LGBTの患者を適切に診療するために必要と考える1)知識、2)技術、3)設備や環境について記述式で回答を求めた。

募集方法：対象者にハガキを郵送し、QRコードからWeb上のアンケートへの回答を依頼した。

分析方法：尺度への回答部分は記述統計や重回帰分析を使用し、記述部分は計量テキスト分析KH Coder ver. 3を用いて統計処理を行った。

倫理的配慮：本研究の関係者は、「世界医師会ヘルシンキ宣言」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守して本研究を実施する。本研究は、説明文書を読み承諾した対象者のみが自己記入式アンケートに回答する方式を取っているため、調査票への回答を持って同意を得たこととする。説明文書は倫理委員会で承認されたものを用いる。また、調査票を簡素化するにあたり、研究説明文書はWeb上に公開し、研究協力者各自が説明文書を読んだ上で調査票に回答するよう依頼する。本研究は介入を行わない調査研究であり侵襲性は極めて低いと考えられるが、アンケートに回答することで健康被害が生じた場合は相談を受け付け、必要な支援を案内する。研究に関する問い合わせや相談は研究期間中いつの時点でも受け付ける。問い合わせ方法としては電話、メール、文書とし、電話の場合は対応者が必ず記録を残すこととする。即時回答が難しい内容に関しては1か月以内には回答する。

(結果)

3,733件ハガキを発送し、Web調査への全回答172のうち、有効回答は168 (4.5%) であった。平均年齢47.3歳 ($SD \pm 10.0$)、89.3%が医師であり、精神科従事歴は平均17.4年 ($SD \pm 12.2$)、66.7%が日本児童青年精神医学会の会員であり、LGBTの健康問題に関する特定のトレーニングを受けたことがあると答えたのは13.7%であった。GAP合計点は75点満点中平均50.3点 ($SD \pm 12.7$)、LGBT-DOCSS合計点は90点満点中平均63.4点 ($SD \pm 8.7$)、サブカテゴリーの知識は20点満点中平均12.8点 ($SD \pm 3.1$)、態度は35点満点中平均30.1点 ($SD \pm 3.5$)、臨床準備状態は35点満点中平均20.5点 ($SD \pm 4.8$) であった。GAP合計点とLGBT-DOCSS合計点は有意に正の相関 ($r = .70, p < .01$) がみられた。GAP合計点とLGBT-DOCSSのサブカテゴリーにおける重回帰分析の結果、LGBTへの臨床実践には知識 ($\beta = .40, p < .01$, confidence interval [1.12, 2.16]) と臨床準備状態 ($\beta = .40, p < .01$, confidence interval [.72, 1.39]) が有意な影響を及ぼしていることが示された。

LGBTの健康問題に関する特定のトレーニングを受けたことがあると答えたのは13.7%で

あった。3問の記述式設問に回答したのは67.3% (n=113) であった。テキスト分析の結果、知識のニーズとして3カテゴリー：【LGBT特有の健康問題やその社会背景】【必要な配慮や専門的治療】【活用できる社会資源】、技術として3カテゴリー：【基本的な面接技術】【敬意を払う態度】【LGBTに関する心理教育】、設備や環境として3カテゴリー：【個室の病室やトイレ】【プライバシーが配慮できるシステム】【LGBTへの情報発信】が抽出された。

(成果・考察)

LGBT当事者の健康問題に関するトレーニングを受けたことがある精神科医師看護師はわずかであった。LGBT当事者への肯定的な臨床実践にはLGBTの健康問題に対する知識や臨床準備状態が関連しており、態度は有意な関連はみられなかった。先行研究(Hughes et al., 2018)においても、トレーニングを受けていることはLGBTの健康問題へ対処するための知識には肯定的に影響を与えるが、スーパーバイズの不足や臨床実践のためのトレーニングの必要性が述べられていた。つまり、精神科医師看護師が、LGBT当事者に肯定的な臨床実践を行うには、専門職としてLGBTへの知識や技術を得ることができる研修やスーパービジョンを受けることができるシステムが重要であると示唆された。

対象者は、LGBTに適切な医療を提供するために必要な知識として、LGBTの治療対象部分だけでなく社会的背景も知る必要があると考えており、精神科救急や児童精神の現場で普段から実践されている包括的な関わりの視点を持ってLGBTにも対応する必要があると認識していることがうかがえた。海外では、医学部生や看護学生に対して、LGBTの健康問題に関する講義を実施すると、実施前後の比較で有意に知識が向上し態度が肯定的となったことが示されている(Kelley et al., 2008, Wahlen et al., 2020)。また、技術に関しては特別な技術というよりも、基本的な精神医療で必要とされる技術があれば対応できると認識していた。つまり、LGBTの知識を得ることができれば元々持っている技術を応用することで対応可能であると考えられる。一方で、設備や環境に関しては、プライバシーを守ることができる新たな設備やシステム、それをLGBT当事者にだけ分かるような周知方法を望んでおり、病院組織全体の中でLGBTが安心して医療を受けることが出来る環境を検討する必要が示唆された。先行研究(Wang et al., 2020)においても、安全とプライバシーが守られる環境が必要と指摘されている。前述の研究(Wang et al., 2020)では、記述式への回答率が全体の半数以下だったのに対し、本調査では多くの回答が寄せられた。LGBTへの関心の高まりと、臨床現場での対応に苦慮するため、トレーニングやシステム整備への期待が高まっているのかもしれない。

(引用文献)

- CLEMENTS-NOLLE, K., MARX, R. & KATZ, M. 2006. Attempted suicide among transgender persons: The influence of gender-based discrimination and victimization. *Journal of Homosexuality*, 51, 53-69.
- HERBST, J. H., JACOBS, E. D., FINLAYSON, T. J., MCKLEROY, V. S., NEUMANN, M. S. & CREPAZ, N. 2008. Estimating HIV prevalence and risk behaviors of transgender persons in the United States: a systematic review. *AIDS Behav*, 12, 1-17.

- HIDAKA, Y., OPERARIO, D., TAKENAKA, M., OMORI, S., ICHIKAWA, S. & SHIRASAKA, T. 2008. Attempted suicide and associated risk factors among youth in urban Japan. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 43, 752-757.
- HUGHES, E., RAWLINGS, V. & McDERMOTT, E. 2018. Mental Health Staff Perceptions and Practice Regarding Self-Harm, Suicidality and Help-Seeking in LGBTQ Youth: Findings from a Cross-Sectional Survey in the UK. *Issues in Mental Health Nursing*, 39, 30-36.
- KATZ-WISE, S. L. & HYDE, J. S. 2012. Victimization experiences of lesbian, gay, and bisexual individuals: a meta-analysis. *J Sex Res*, 49, 142-67.
- KELLEY, L., CHOU, C. L., DIBBLE, S. L. & ROBERTSON, P. A. 2008. A critical intervention in lesbian, gay, bisexual, and transgender health: Knowledge and attitude outcomes among second-year medical students. *Teaching and Learning in Medicine*, 20, 248-253.
- KITTS, R. L. 2010. Barriers to Optimal Care between Physicians and Lesbian, Gay, Bisexual, Transgender, and Questioning Adolescent Patients. *Journal of Homosexuality*, 57, 730-747.
- MEREISH, E. H., O'CLEIRIGH, C. & BRADFORD, J. B. 2014. Interrelationships between LGBT-based victimization, suicide, and substance use problems in a diverse sample of sexual and gender minorities. *Psychology Health & Medicine*, 19, 1-13.
- SCHEER, J. R. & ANTEBI-GRUSZKA, N. 2019. A Psychosocial Risk Model of Potentially Traumatic Events And Sexual Risk Behavior Among LGBTQ Individuals. *Journal of Trauma & Dissociation*, 20, 603-618.
- SMITH, D. M. & MATHEWS, W. C. 2007. Physicians' attitudes toward homosexuality and HIV: Survey of a California Medical Society Revisited (PATHH-II). *Journal of Homosexuality*, 52, 1-9.
- WAHLEN, R., BIZE, R., WANG, J., MERGLEN, A. & AMBRESIN, A. E. 2020. Medical students' knowledge of and attitudes towards LGBT people and their health care needs: Impact of a lecture on LGBT health. *Plos One*, 15.
- WANG, Y. C., CHANG, S. R. & MIAO, N. F. 2020. Taiwanese Nurses' Attitudes Towards and Knowledge About Sexual Minorities and Their Behavior of Providing Care to Sexual Minority Patients: Results of an Online Survey. *Journal of Nursing Scholarship*, 52, 605-612.
- 佐藤, 卓., 福島, 裕., 野口, 恭., 岩渕, 香. & 多田, ま. 2017. 岩手県の高校生の生と性に関する調査(2013-2014) セクシュアリティの実態. *思春期学*, 35, 217-227.
- 品川, 由. 2006. 男性同性愛者に対するカウンセラーのクリニカル・バイアスとジェンダー関連要因との関係--実験法によるカウンセラー反応の検討. *広島大学大学院教育学研究科紀要 第三部 教育人間科学関連領域*, 297-306.

中枢神経系のMRI画像異常と発達障害をきたす *De novo ARF3* 変異の機能解析

横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学教室 博士課程
坂本正宗

(研究目的)

当教室ではてんかん、神経発達病を主な対象症例とし、次世代シークエンサーを用いた網羅的な遺伝学的解析を実施し、遺伝学的診断および新規遺伝子の解明を行ってきた。今回、中枢神経系の画像異常と発達障害を伴う2名の患者に*De novo ARF3* 変異 (MIM:103190), NM_001659.2: c. 200A>T (p. Asp67Val) と c. 296G>T (p. Arg99Leu) を認めた。これまでにARF3変異を原因とするヒト疾患の報告はなく、機能解析を行い両変異の病原性を示すことを目的とした。

ARF3は低分子量G蛋白質に属し、トランスゴルジにおいて物質の輸送の起点となる。ARF3にはGDP結合型とGTP結合型の2つの形態があり、後者において活性を示す[1]。

(研究方法)

1. 臨床所見の調査

主治医と連携し患者2名の詳細な病歴、神経所見を調査した。

2. コンストラクション

Gateway Cloningシステムを利用して、ARF3のC末にGFPおよびV5タグを導入した。変異体はKOD-Mutagenesis Kitを用いて、病的候補である2つの変異に加えて、既報のdominant negative作用を持つp. Thr31Asnと恒常活性作用を持つp. Gln71Leuを作成した。また、活性型ARF3と結合能があるGolgi-localized, γ -adapton ear-containing, ARF-binding protein1 (GGA1)のGATドメインを用いてGST-GGA1-GAT複合蛋白質を作成しプルダウン解析に使用した[2]。

3. 細胞内の局在実験

既報を参照し[2]、HeLa細胞にARF3-GFPを一過性に発現させ、抗GFP抗体、抗GM130抗体（ゴルジ体マーカー）、二次抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡（Zeiss LSM 980）で観察を行った。

4. プルダウン解析

既報を参照し[2][3]、HEK293T細胞にARF3-V5を一過性に発現させ、抽出した蛋白質に対して、GTP- γ sの添付有り無しの二条件を設け、GST-GGA1-GATによるプルダウン解析を行った。

5. タンパク質立体構造から検討

既報のタンパク質立体構造から変異の機能的影響について検討した。

6. ショウジョウバエを用いた解析

ヒトARF3遺伝子をショウジョウバエに組み込んだ遺伝子組み換え体を作成した。Gal4システムを用いて[4]、局所（複眼近傍）での発現を誘導し、OM-DE-M5で複眼の画像を撮影し、Flynotyperを用いて複眼の表現型をスコア化した。

(結 果)

1. 臨床像

患者1 (p. Asp67Val) は出生時より小頭症を認め、進行性の大脳萎縮を認めた (図1A-D)。てんかんを認めたがコントロールは良好であった。発達の遅れは最重度で、4歳時に寝返り不可で、有意後も認めなかつた。患者2 (p. Arg99Leu) は幼少期より発達遅滞を認め、2歳5か月時、自立が出来ず、有意語を認めなかつた。頭部MRIでは小脳低形成を認めたが、進行性病変はなかつた。てんかんは治療難治であった。14歳時、支援学校に通学しており、独歩は可能で、数語の有意語を認めた。

2. ARF3細胞内局在実験

野生型ARF3とp. Arg99Leuミュータントは核周囲にゴルジ体と一致する限局を認めたが、p. Thr31Asnおよびp. Asp67Valミュータントは一部の細胞で上記の限局が失われ、同時にゴルジ体の形態にも異常を示した (図2)。

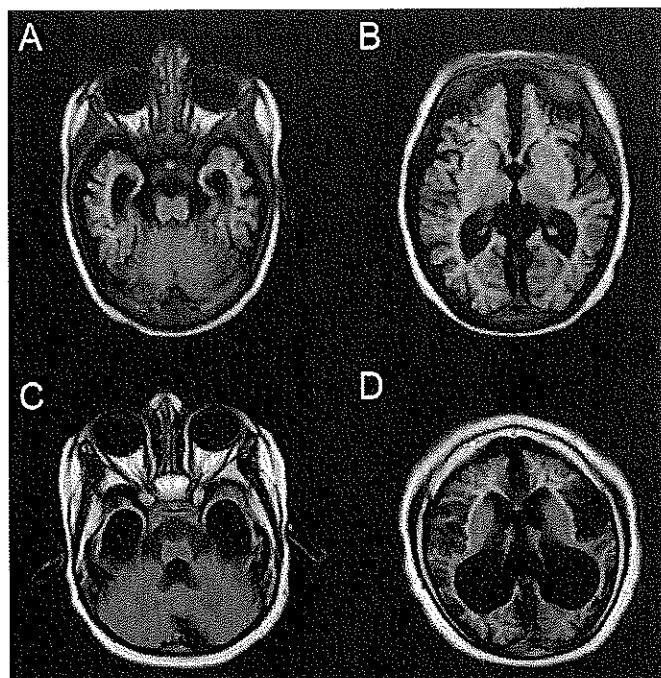
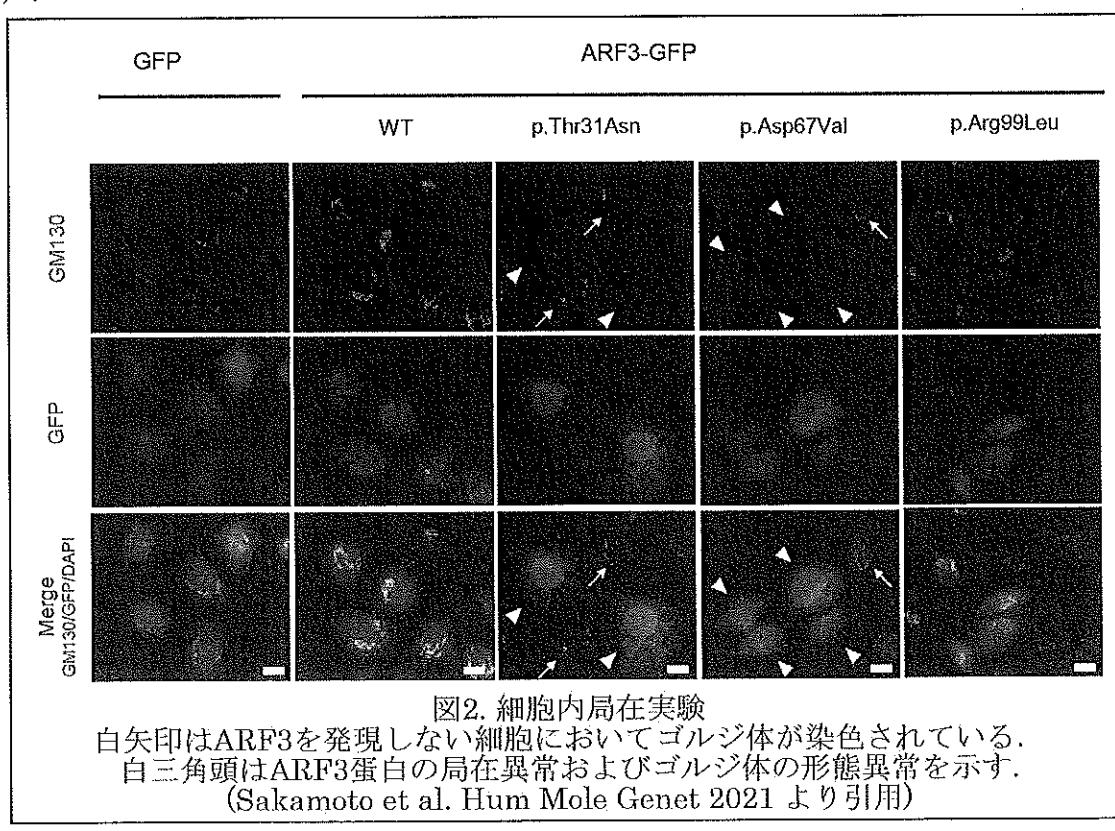


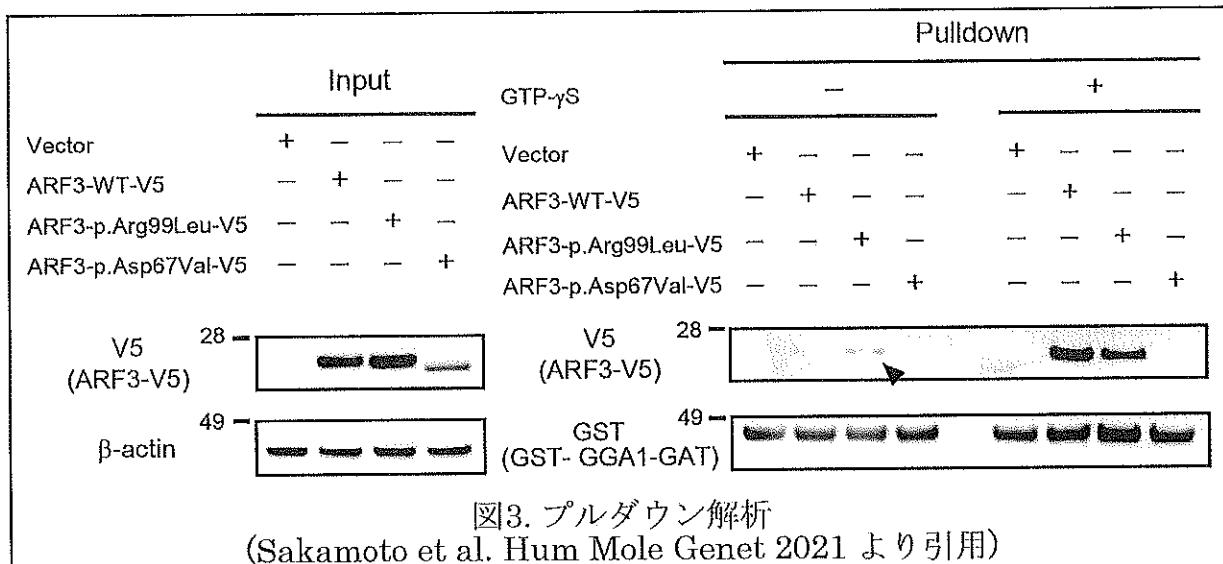
図1. 頭部MRI画像

患者1 (A-B:2か月時, C-D:2歳時) は進行性大脳萎縮を示した。 (Sakamoto et al. Hum Mole Genet 2021より引用)



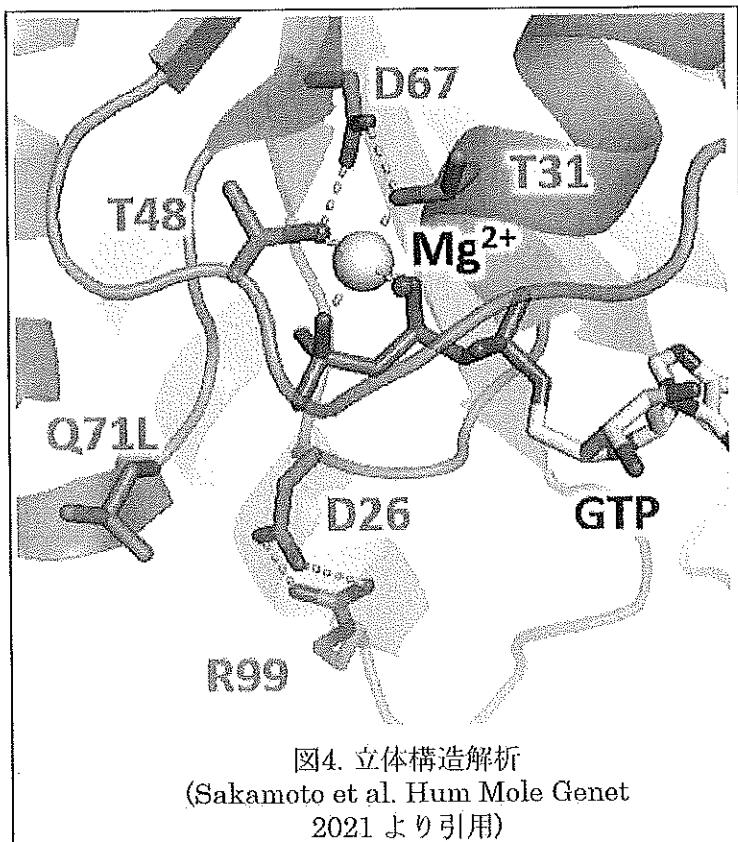
3. プルダウン解析

ARF3の活性に重要なGTP- γ Sの非存在下でもp. Arg99Leuが優位に検出された（図3右）。GTP- γ Sを添付した条件では野生型とp. Arg99Leuで検出されたが、p. Asp67Valでは検出されなかった。



5. 三次元モデルからの考察

Arf3-p. Q71LとGTPが結合した構造を図4に示す。p. T31やp. D67はGTP結合に必須であるMg²⁺イオンの安定化に寄与しており、p. D67VがARF3の活性化に深刻な影響を与えると推測できる。既報変異のp. Q71LはGTPの加水分解に必要な水分子のGTPへのアプローチを妨げることで恒常活性を示すが、p. Q71から離れているp. R99Lは同じ理屈では説明できない。GTP結合部位であるポケットの裏打ちをしているp. D26とp. R99は相互作用を有しており、p. R99Lはこのポケットに影響を及ぼすことで間接的にGTPの加水分解を障害し、恒常性の原因となっていると推測した。



6. ショウジョウバエを用いた解析

野生型のヒトARF3-GFPを局所発現させたハエは正常な複眼を示したのに対して、p.Q71Lとp.R99Lミュータントを発現したハエは複眼の形成異常（rough eye）を示した（図5）。p.Gln71Leuはp.Arg99Leuと比較し色素脱が強く、病原性が強いことが示唆された。一方で、p.Thr31Asnとp.Asp67Valを発現したハエは致死であり、複眼の評価はできなかった。p.Thr31Asnとp.Asp67Valについて、局所発現にも関わらず個体死を示し毒性の高さが示された。この現象はハエの飼育環境を25度から20度に下げARF3蛋白の発現を低下させた条件でも同様に致死であった。

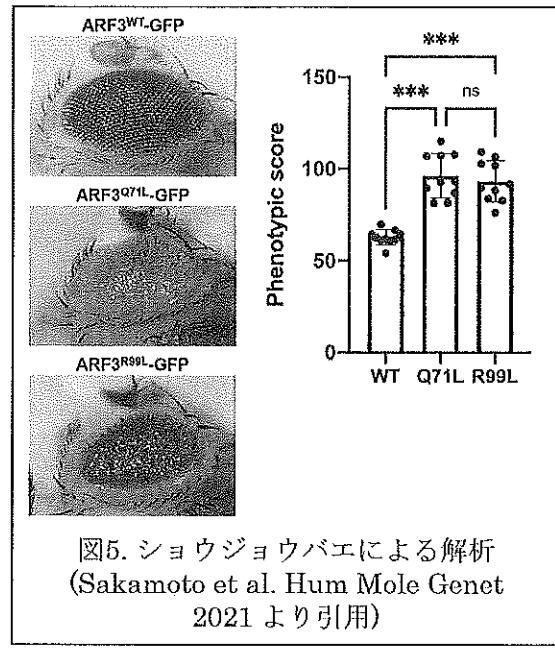


図5. ショウジョウバエによる解析
(Sakamoto et al. Hum Mol Genet 2021より引用)

（成果・考察）

これまでヒト疾患の報告がないARF3の二つの病的変異c. 200A>T (p.Asp67Val)とc. 296G>T (p.Arg99Leu)について機能解析を行った。臨床像に発達遅滞、てんかん、頭部MRI画像異常という共通点を認めたが、重篤度や臨床経過の違いから両変異が異なる機能を有すると推測した。細胞内局在実験では、p.Arg99Leuは野生型と同様の局在を示し、p.Asp67Valは既報の dominant negative作用を持つとされるp.Thr31Asnと同様の局在異常を示した。プロトドメイン解析では、p.Arg99Leuは機能増強を示し、p.Asp67Valは機能低下を示した。ショウジョウバエを用いた実験では、p.Gln71Leuとp.Arg99Leuを発現したハエでは複眼に類似の表現型（rough eye）を認めた。p.Thr31Asnとp.Asp67Valを発現させたハエは致死であった。生化学的な構造解析において、p.Thr31とp.Asp67はヌクレオチド結合モチーフに位置し、マグネシウムの安定化と共にGTP結合に重要な役割を果たしており、同部位の変異がGTP結合に影響し、ARF3の活性化に障害を起こしていると推測された。一方、GTP結合部ポケット構造を裏打ちするp.D26とp.Arg99は相互作用を有しており、p.Arg99Leuは間接的にGTPの加水分解を妨げることで恒常性を呈していると推察された。以上のことからp.Asp67Valは機能低下作用を、p.Arg99Leuは機能増強作用を有する変異であることを明らかにした。

本研究は、2021年 Human Molecular Geneticsに印刷中である。

（参考文献）

- [1] Tan, J.Z.A. and Gleeson, P.A. (2019) Cargo Sorting at the trans-Golgi Network for Shunting into Specific Transport Routes: Role of Arf Small G Proteins and Adaptor Complexes. *Cells*, 8.
- [2] Takatsu, H., Yoshino, K., Toda, K. and Nakayama, K. (2002) GGA proteins associate with Golgi membranes through interaction between their GGAH domains and ADP-ribosylation factors. *Biochem. J.*, 365, 369-378.
- [3] Sasaki, K., Kakuwa, T., Akimoto, K., Koga, H. and Ohno, S. (2015) Regulation of epithelial cell polarity by PAR-3 depends on Girdin transcription and Girdin-Galphai3 signaling. *J. Cell. Sci.*, 128, 2244-2258.
- [4] Newsome, T.P., Schmidt, S., Dietzl, G., Keleman, K., Asling, B., Debant, A. and Dickson, B.J. (2000) Trio combines with dock to regulate Pak activity during photoreceptor axon pathfinding in Drosophila. *Cell*, 101, 283-294.